

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: 0 529 300 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 92112427.7

(51) Int. Cl. 5: C07K 15/26, C07K 3/28,
A61K 37/66

(22) Anmeldetag: 21.07.92

(30) Priorität: 27.08.91 DE 4128319

(71) Anmelder: BIOFERON Biochemische
Substanzen GmbH & Co
Erwin-Rentschler-Strasse 21
W-7958 Laupheim 1 (DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
03.03.93 Patentblatt 93/09

(72) Erfinder: Siklosi, Thomas&NUM;
Alpenweg 15&NUM;
W-7959 Walpertshofen&NUM;(DE)
Erfinder: Joester, Karl-Eduard&NUM;
Bussenweg 5&NUM;
W-7959 Walpertshofen&NUM;(DE)
Erfinder: Hofer, Hans&NUM;
Beim Käppele 11&NUM;
W-7959 Walpertshofen&NUM;(DE)

(74) Vertreter: Schwabe - Sandmair - Marx
Stuntzstrasse 16
W-8000 München 80 (DE)

(54) Neues rekombinantes Human-IFN-beta, Verfahren zu dessen Herstellung und dieses enthaltende pharmazeutische Zubereitungen.

(57) Die Erfindung betrifft ein neues rekombinantes Human-IFN-beta, Verfahren zu dessen Herstellung und dieses enthaltende pharmazeutische Zubereitungen. Das erfindungsgemäße rekombinante IFN-beta besitzt eine höhere Stabilität als die bisher bekannten IFN-beta-Präparationen sowie eine deutlich verbesserte Antitumorwirkung im Vergleich zu natürlichem IFN-beta. Das erfindungsgemäße rekombinante IFN-beta ist durch einen Anteil an biantennären Oligosaccharid-Strukturen von mindestens 60 %, einen Anteil von triantennären Oligosaccharid-Strukturen von mindestens 15 % und einen Anteil von tetraantennären Oligosaccharid-Strukturen von 0 bis 5 % sowie einen Sialinsäuregehalt von mindestens 80 % gekennzeichnet. Es enthält weiterhin gegebenenfalls einen Fucoseanteil. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren, das aus einer Kombination von Phasenverteilung-, Affinitäts-, Metalchelat- und Size-Exclusion-Chromatographie besteht, ist es möglich, das erfindungsgemäße Human-IFN-beta reproduzierbar und in hoher Reinheit mit den vorgenannten Eigenschaften herzustellen. Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen sind insbesondere zur Behandlung des Kaposi Sarkoms geeignet.

EP 0 529 300 A1

Die Erfindung betrifft ein neues rekombinantes Fibroblasteninterferon, Verfahren zu dessen Herstellung und pharmazeutische Zubereitungen enthaltend dieses rekombinante Human-Interferon-beta (IFN-beta).

Natürlich vorkommende Interferone sind speziesspezifische Proteine, meistens Glykoproteine, die von verschiedenen Zellen nach einer Induktion mit Viren, doppelsträngiger RNA, anderen Polynucleotiden, 5 Antigenen und Mitogenen produziert werden. Die Interferone besitzen zahlreiche biologische Aktivitäten. Die wichtigsten sind die antivirale, antiproliferative, immunmodulierende und die antizelluläre Wirkung. Bei den humanen Interferonen unterscheidet man drei Typen, die in Leukocyten, Lymphocyten, Fibroblasten und innerhalb des Immunsystems produziert werden. Sie werden als alpha-, beta- und gamma-Interferone bezeichnet.

10 Natürliche Human-IFN-beta wird von induzierten Humanfibroblasten-Zellkulturen produziert und aus dem Zellkulturüberstand isoliert und gereinigt. Proteine oder Polypeptide mit Human-IFN-beta-Aktivität können auch unter Verwendung der rekombinanten DNA-Technik in Mikroorganismen oder eukaryotischen Zellsystemen, wie z. B. Säugerzellkulturen, produziert werden, vgl. William E. Stewart II, The Interferon System, 2. Ausgabe, Springer-Verlag Wien, New York (1981); EP-A 41 313; W. Reiser und H. Hauser, 15 Arzneim. Forsch./Drug. Res. 37 (1), Hr. 4 (1987), Seite 482; Mc Cormac et al., Molecular and Cellular Biology, Vol. 4, No. 1, Seite 166 (1984).

Natürliche und rekombinante Interferone wurden bisher mit mehr oder weniger großem Erfolg zur Behandlung von Patienten mit Tumor-, Virus- und Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Mit verschiedenen 20 alpha-Interferonen wurde ein Tumor-Response von 20 bis 40 % von Patienten im Frühstadium des mit AIDS verbundenen Kaposi-Sarkoms beobachtet. Nachteilig bei der Behandlung mit alpha-Interferon ist jedoch die hämatologische Intoleranz und hepatische Komplikationen, die die einsetzbare Dosis limitieren. Ein weiterer Nachteil bei der IFN-alpha-Behandlung und gleichzeitiger Verabreichung von Azidothymidin liegt darin, daß beide Substanzen eine hohe hämatologische Toxizität besitzen, so daß eine gemeinsame Verabreichung mit nicht tolerablen Nebenwirkungen verbunden ist und damit ausscheidet; vgl. Annals of Internal Medicine, 25 Vol. 112, No. 3, 582 (1990).

25 Fibroblasten-Interferon (IFN-beta) besitzt viele immunologische Eigenschaften, die mit denen des IFN-alpha vergleichbar sind. Jedoch wird IFN-beta wesentlich besser toleriert und besitzt offensichtlich auch eine geringere hämatologische Toxizität als IFN-alpha in den bisher untersuchten Fällen von Nierenzellkarzinom und lymphoiden Tumoren. In in vitro Untersuchungen inhibiert IFN-beta das HIV-Virus und zeigt eine 30 synergistische antiretrovirale Aktivität mit Azidothymidin.

Da bei längerer Verabreichung von Azidothymidin allein eine Resistenz entwickelt wird, wäre es von großem Vorteil, über Substanzen wie IFN-beta zu verfügen, die sich im Idealfall hinsichtlich der antiretroviralen Aktivität, des Wirkmechanismus und des Toxizitätsprofils von Azidothymidin unterscheiden.

Ein weiterer Nachteil der Interferone, insbesondere auch der rekombinanten, ist ihre Instabilität. 35 Insbesondere die hochreinen Interferonpräparate für die klinische Anwendung zeigen sowohl im flüssigen als auch im lyophilisierten Zustand einen raschen Aktivitätsverlust. Für Interferone, die mittels der rekombinanten DNA-Technologie in Bakterien hergestellt werden, besteht ein weiterer Nachteil darin, daß auf diese Art produzierte Interferone in wässrigen Lösungen nahezu unlöslich sind.

Aus dem Stand der Technik sind zahlreiche Vorschläge zur Überwindung dieser Nachteile bekannt, 40 wobei die meisten dieser Verfahren den Zusatz verschiedenster chemischer Verbindungen zur Interferonpräparation vorschlagen, um die Löslichkeits- und/oder Stabilitätsprobleme zu beseitigen.

Alle derartige Verfahren besitzen jedoch nach wie vor die Nachteile, daß sie bei der Herstellung der Interferonpräparation einen zusätzlichen Arbeitsschritt erfordern, daß die Stabilität weiterhin nicht befriedigend ist und daß viele der Zusätze medizinisch nicht zulässig sind, weil sie entweder bekanntermaßen 45 toxische Wirkungen besitzen oder weil ihre Toxikologie bislang ungeklärt ist, so daß derartige Zusätze von vornehmlich für eine klinische Verwendung ausscheiden; vgl. EP-A 270 799, EP-A 89 245, EP-A 217 645, EP-A 215 658, WO 89/05158, WO 89/02750, EP-A 82 481, EP-A 80 879, US-PS 44 83 849 und WO 90/03784.

Die Anmelderin hat nun überraschend gefunden, daß mit einem IFN-beta, dessen Herstellung im 50 folgenden beschrieben wird, nicht nur eine unerwartet verbesserte Antitumorwirkung erzielbar ist, sondern auch stabile flüssige oder feste (lyophilisierte) Zubereitungen als die im Stand der Technik bekannten, hergestellt werden können.

Erfindungsgemäß werden daher ein neues rekombinantes IFN-beta, Verfahren zu dessen Herstellung sowie stabile pharmazeutische Zubereitungen von IFN-beta in flüssiger oder lyophilisierter bzw. fester Form 55 zur Verfügung gestellt, die hochreines rekombinantes IFN-beta in hohen Dosen ohne irgendwelche pharmakologisch nachteiligen Zusätze enthalten. Das erfundungsgemäß IFN-beta besitzt eine höhere Antitumorwirkung, insbesondere beim Kaposi-Sarkom, als die bislang getesteten IFN-beta-Präparationen von natürlichem oder rekombinantem IFN-beta.

EP 0 529 300 A1

Erfindungsgemäß wird das neue IFN-beta mittels der rekombinanten DNA-Technik in Säugerzellkulturen produziert und durch ein Verfahren, das aus einer Kombination von Phasenverteilung-, Affinitäts-, Metallchelat- und Size-Exclusion-Chromatographie besteht, hergestellt. Die einzelnen Schritte können auch in einer anderen Reihenfolge, wie z. B. Phasensystem-, Metallchelat-, Affinitäts- und Size-Exclusion-Chromatographie, ausgeführt werden oder in jeder beliebigen Reihenfolge wiederholt werden, wobei die Phasenverteilung als erster Schritt obligatorisch ist.

5 Das durch das erfundungsgemäße Verfahren hergestellte rekombinante humane IFN-beta ist somit gekennzeichnet durch:

- 10 (a) ein bestimmtes Glykosylierungsmuster;
- (b) eine hohe Volumenaktivität von $> 40 \times 10^6$ IU/ml;
- (c) hohe Eigenstabilität;
- (d) höhere klinische Wirksamkeit, insbesondere eine höhere Antitumorwirkung.

Zur Herstellung des erfundungsgemäßen IFN-beta werden bevorzugt transfizierte Zellen der CHO-Linie (chinese hamster ovary) mit der Laborbezeichnung BIC 8622 (Konstruktion der animalen Zelllinie, vgl. 15 Europäische Patentanmeldung Nr. 0 287 075), in üblichem Zellkulturmedium (Modified Eagles Medium (MEM) mit Earles Salzen), supplementiert mit 0 bis 5 % fötalem Kälberserum (FCS), in stationärer Kultur zur Konfluenz gebracht. Die Zellen sezernieren konstitutiv zwischen 1×10^8 und 2×10^9 Internationale Einheiten (IU) pro Tag und pro Liter Kulturüberstand.

20 Erfindungsgemäß wird das IFN-beta weiter über flüssig/flüssig Phasenextraktion angereichert, wobei wässrige Zweiphasensysteme auf der Basis Polyalkylenglykol/Dextran oder Polyalkylenglykol/Salz zum Einsatz kommen.

Bei den Polyalkylenglykolen können Polyethylenglykole und/oder Polypropylenglykole eingesetzt werden. Als Polyethylenglykole können Polyethylenglykole mit einem MW von 1.000 bis 6.000, bevorzugt 25 1.200 bis 3.000, am meisten bevorzugt 1.500 bis 2.000 verwendet werden. Die Konzentration liegt im Bereich von 1 bis 30 Gew.-%, bevorzugt 2 bis 15 Gew.-%, am meisten bevorzugt 3 bis 9 Gew.-%. Als Polypropylenglykole können Polypropylenglykole mit einem MW von 1.500 bis 4.000 verwendet werden. Die verwendeten Konzentrationen entsprechen denen für die Polyethylenglykole. Als Dextran können Dextrane mit einem Molekulargewicht von 15.000 bis 5.000.000, bevorzugt 100.000 bis 1.000.000, am meisten bevorzugt 350.000 bis 550.000 verwendet werden. Die Konzentration liegt im Bereich von 1 bis 10 30 Gew.-%, bevorzugt 2 bis 6 Gew.-% und am meisten bevorzugt im Bereich von 4 bis 6 Gew.-%.

Als Salze können NaCl, LiCl, NaJ, KJ, Na₂SO₄, Na₂HPO₄, K₂HPO₄, K₂SO₄, NaH₂PO₄, KCl, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, Na-Citrat und Na-Oxalat allein oder in Mischung verwendet werden. Die Konzentration des Salzes liegt im Bereich von 2 bis 30 Gew.-%, bevorzugt 3 bis 20 Gew.-% und am meisten bevorzugt im Bereich von 4 bis 16 Gew.-%.

35 Das IFN-beta enthaltende Zellkulturmedium wird zusammen mit den Bestandteilen der beschriebenen wässrigen Phasensysteme intensiv für 5 bis 24 h, bevorzugt 8 bis 16 h, am meisten bevorzugt 10 bis 12 h bei 4 bis 25 °C, bevorzugt 10 bis 20 °C, am meisten bevorzugt 13 bis 18 °C gerührt und nach der Entmischung und Abtrennung in der Polyalkylenglykol-haltigen Oberphase angereichert.

40 Die Trennung der wässrigen Phasen geschieht durch Gravitation oder durch Separation.

45 Die Polyalkylenglykol-haltige Oberphase enthält rekombinantes IFN-beta in einer Konzentration von 1×10^8 bis 1×10^{10} IU/Liter. Die spezifische Aktivität beträgt 5×10^6 bis 3×10^7 IU/mg Protein. Die Ausbeuten liegen nahezu bei 100 %.

Für die sich anschließende Affinitätschromatographie wird Blau-Dextran-Sepharose ^R, oder andere geeignete mit Cibacron ^R Blau immobilisierte Matrices wie Matrix Gel Blue A von Amicon oder Fraktogel 50 TSK AF-Blue von Merck oder Blue-Sepharose ^R 6FF von Pharmacia, verwendet.

Die aus dem Phasensystem stammende Oberphase wird mit NaCl auf eine Konzentration zwischen 0,5 und 1,0 mol/l gebracht und mit einer Flußrate von 1 bis 5 cm/min auf die Affinitätsäule aufgetragen. Nach Waschung mit PBS, pH 7, oder PBS, enthaltend 1 bis 30 Gew.-% Ethylenglykol und/oder 1 bis 15 % Propylenglykol, wird anschließend mit PBS, enthaltend 10 bis 70 Gew.-% Ethylenglykol und/oder 20 bis 50 Gew.-% Propylenglykol, eluiert.

Nach diesem Schritt weist das rekombinante IFN-beta eine Konzentration von 6×10^6 bis 9×10^7 IU/ml Eluat und eine spezifische Aktivität von 50×10^6 bis 140×10^6 IU/mg Protein auf. Die Ausbeuten liegen zwischen 70 und 90 %.

Für die Metallchelatchromatographie sind verschiedene Matrices mit chemisch identischen oder unterschiedlichen Liganden geeignet. Die zur koordinativen Bindung von rekombinantem IFN-beta geeigneten Metallionen können Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ oder Ni²⁺ Ionen sein. Die Desorption kann mittels kompetitiver Substanzen wie Imidazol, Histidin, Glycin oder NH₄Cl, Chelatbildner wie EDTA, IDA (Iminodiessigsäure), TED (Tris-Carboxymethylmethylethylendiamin) oder durch Erniedrigung des pH-Wertes auf pH 2 bis 4

erfolgen.

Geeignete Trennmedien sind Immobilized Iminodiacetic Acid gekoppelt an Agarose oder an Fraktogel TSK HW-65F der Firma Pierce oder Chelating Sepharose^R FF der Firma Pharmacia oder Cellufine Chelate der Firma Amicon.

5 Das Chromatographiemedium wird dazu in eine geeignete Chromatographiesäule gefüllt und mit dem entsprechenden Metallkation beladen, indem man eine Lösung dieses Metallions über die Säule pumpt. Nach Äquilibrieren mit einem geeigneten Puffer, z. B. PBS, enthaltend 0,1 bis 1,0 mol/l NaCl, wird das Eluat der Affinitätschromatographie mit einer Fließrate von 0,75 bis 1,5 cm/min aufgetragen. Die Säule wird anschließend mit einem Gradienten von 0 bis 100 mmol/l Imidazol in PBS eluiert. Alternativ kann auch ein
10 pH-Gradient von pH 7 bis pH 2, hergestellt durch Mischen der Puffer A (PBS; pH 7) und Puffer B (0,2 mol/l Glycin/HCl; pH 2), zur Elution verwendet werden. Die isokratische Elution mit PBS/Glycin/HCl-Puffern mit sinkenden pH-Werten ist ebenfalls möglich.

15 Nach diesem Reinigungsschritt weist das rekombinante IFN-beta eine Konzentration von 50×10^6 bis 300×10^6 IU/ml Eluat und eine spezifische Aktivität von 150×10^6 IU/mg bis 220×10^6 Protein auf. Die Ausbeuten liegen zwischen 60 und 90 %.

20 Für die Size-Exclusions-Chromatographie sind verschiedene Trennmedien geeignet, die einen Fraktionsbereich zwischen etwa 1.000 und etwa 600.000 Dalton aufweisen. Beispielsweise können Sephadex^R G150, G150 superfine, Sephadryl^R S-200 High Resolution, Superose^R 12 prep grade der Firma Pharmacia oder TSK-SW 3000 der Firma Toyo Soda verwendet werden.

25 Das Chromatographiemedium wird dazu in eine geeignete Chromatographiesäule gefüllt und nach Absetzen mit einem geeigneten Puffer äquilibriert. Als Puffer kommen PBS mit 0 bis 0,5 mol/l NaCl zum Einsatz. Das Eluat der Metallchromatographie wird mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 bis 0,8 cm/min aufgetragen. Die Chromatographie erfolgt mit Laufpuffer PBS, enthaltend 0 bis 0,5 mol/l NaCl.

30 Nach diesem Reinigungsschritt weist das rekombinante IFN-beta eine Konzentration von 15×10^6 bis 50×10^6 IU/ml Eluat und eine spezifische Aktivität von 200×10^6 bis 300×10^6 IU/mg Protein auf. Die Ausbeuten liegen zwischen 60 und 80 %.

Das erhaltene Material kann anschließend direkt weiterverarbeitet werden oder bei - 20 °C gelagert werden.

35 Alle Reinigungsschritte werden bei einer Temperatur von 4 bis 15 °C durchgeführt.
30 Die Anmelderin hat gefunden, daß das wie vorstehend beschrieben hergestellte IFN-beta einen hohen Anteil an verzweigten Kohlenhydratkettchen, biantennär, triantennär, triantennär mit mindestens einem Repeat und tetraantennär sowie einen hohen Gehalt an Sialinsäure und Fucose aufweisen muß, um zur Lösung des gegebenen Problems geeignet zu sein.

40 Es wurde gefunden, daß das erfindungsgemäße rekombinante IFN-beta einen Anteil an biantennären Oligosaccharid-Strukturen von mindestens 60 %, bevorzugt 70 % und am meisten bevorzugt 75 % ausweist. Ein weiterer wesentlicher Bestandteil des erfindungsgemäßen rekombinanten IFN-beta ist ein Anteil an triantennären Strukturen, gegebenenfalls mit mindestens einem Repeat, die 1->4 und 1->6 verknüpft sind, wobei der Anteil an triantennären Strukturen mindestens 15 %, bevorzugt 20 % und am meisten bevorzugt 25 % beträgt. Das erfindungsgemäße rekombinante IFN-beta enthält weiterhin einen Anteil von 0 bis 5 % an tetraantennären Oligosaccharid-Strukturen.

45 Das erfindungsgemäße rekombinante IFN-beta weist in seinem gesamten Oligosaccharidanteil einen Sialinsäuregehalt von mindestens 80 %, bevorzugt 85 % und am meisten bevorzugt von > 90 % auf. Der Sialinsäureanteil setzt sich dabei aus 90 bis 100 % N-Acetylneuraminsäure und 0 bis 10 % N-Glykolyneuraminsäure zusammen.

50 Das erfindungsgemäße rekombinante IFN-beta enthält darüberhinaus Fucose. Obwohl der Fucosegehalt für die Stabilität offensichtlich nicht wesentlich ist, beträgt der Anteil 85 %, bevorzugt 90 % und am meisten bevorzugt > 95 %.

55 Neben den hier verwendeten CHO-Zellen können auch andere eukaryotische Zellen, wie z. B. BHK- und LTK-Zellen, zur Produktion des IFN-beta verwendet werden. Voraussetzung ist lediglich, daß die eukaryotischen Zellen zur Expression des rekombinanten IFN-beta mit einem wie vorstehend beschriebenen Glykosylierungsmuster in der Lage sind.

Verfahren zur Produktion von rekombinantem IFN-beta in CHO-Zellen werden in der EP-A 287 075 sowie in Arzneim. Forsch./Drug. Res. 37 (I), Nr. 4, 482 (1987), Molecular and Cellular Biology, Jan. 1984, Seite 166 und DNA, Vol. 3, Nr. 4, Seite 297 (1984) beschrieben.

55 Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Zubereitungen, die rekombinantes IFN-beta mit den vorstehend beschriebenen Merkmalen in Verbindung mit bekannten und üblichen Träger- und Hilfsstoffen enthalten.

Zu den erfindungsgemäßen Zubereitungen sind auch high dosage-Zubereitungen zu zählen, d. h. Zubereitungen die pro Zubereitung zwischen etwa 18×10^6 und etwa 50×10^6 IU, bevorzugt etwa 20×10^6 bis etwa 40×10^6 IU und besonders bevorzugt etwa 25×10^6 bis 30×10^6 IU IFN-beta enthalten.

Als Trägerstoff kann z. B. ein Puffer auf wässriger Basis verwendet werden, wobei der pH-Wert des 5 Lösungsmittels im physiologisch akzeptablen, bevorzugt im neutralen Bereich, d. h. in einem Bereich von etwa 4 bis etwa 8 liegt.

Es ist nicht erforderlich, pH-Werte < 4 oder > 8 zu verwenden, um den Wirkstoff zu lösen. Ebenfalls kann auf den Zusatz von lösungsvermittelnden Substanzen, wie SDS oder anderen Detergentien, verzichtet werden.

10 Es werden lediglich Füllstoffe, bevorzugt ein Serumprotein, wie HSA (humanes Serumalbumin) oder andere bekannte Füllstoffe, wie PVP, verwendet.

Die erfindungsgemäße pharmazeutischen Zubereitungen können zur Behandlung von Tumoren, Viruserkrankungen, Immunopathien oder Entzündungen einschließlich rheumatischer Erkrankungen, Allergien, Psoriasis, Morbus Crohn und degenerativen Erkrankungen des Nervensystems, z. B. Multiple Sklerose, 15 verwendet werden.

Die erforderliche Menge des zu verwendenden rekombinanten IFN-beta (im folgenden als der aktive Bestandteil bezeichnet) im Arzneimittel für die gewünschte therapeutische Wirkung hängt von der jeweiligen Verabreichungsart und von dem zu behandelnden Subjekt, sowie der jeweiligen Krankheit ab. Eine geeignete Dosis des aktiven Bestandteils zur Verabreichung am Menschen liegt zwischen etwa $0,1 \times 10^6$ 20 und 100×10^6 I. E.. Die am meisten bevorzugte Dosis beträgt bei lokaler Therapie etwa $0,1 \times 10^6$ bis etwa 6×10^6 I. E., bei systematischer Therapie etwa 1×10^6 bis 30×10^6 I. E. pro Tag, gegebenenfalls mehrmals pro Tag.

Obwohl es grundsätzlich möglich ist, den aktiven Bestandteil alleine zu verabreichen, ist es vorzuziehen, daß der aktive Bestandteil in Form einer pharmazeutischen Formulierung, die den aktiven Bestandteil 25 in einem dafür pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff enthält, verabreicht wird. Üblicherweise beträgt der aktive Bestandteil in einer derartigen Formulierung 1×10^6 bis 50×10^6 I. E./ml Wirkstofflösung. Für die topische Verabreichung beträgt der aktive Bestandteil etwa $0,1 \times 10^6$ bis 10×10^6 I. E./g Zubereitung.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen enthalten den aktiven Bestandteil in Verbindung mit einem dafür pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff und gegebenenfalls weiteren therapeutisch 30 aktiven Bestandteilen. Der Trägerstoff muß annehmbar in dem Sinne sein, daß er mit den anderen Bestandteilen der Formulierung kompatibel ist und keine nachteilige Wirkung auf den Empfänger der Formulierung besitzt.

Die Formulierungen liegen geeigneterweise in Form einer ophthalmologischen, subkutanen, intrakutanen, intramuskulären, intravenösen, intratekalen, intraartikulären, intratumoralen/peritumoralen, 35 intraleisionalen/perilesionalen oder topischen Verabreichungsform vor.

Die erfindungsgemäßen Formulierungen können durch jedes der auf dem Gebiet der pharmazeutischen Technologie bekannten Verfahren hergestellt werden. Im wesentlichen enthalten alle Verfahren den Schritt des Zusammenbringens des aktiven Bestandteils mit dem Trägerstoff, gegebenenfalls mit einem oder mehreren zusätzlichen Bestandteil. Im allgemeinen werden die Formulierungen durch gleichmäßiges und 40 inniges Vermischen des aktiven Bestandteils mit einem flüssigen Träger oder einem feinverteilten festen Träger oder beiden und anschließend, falls erforderlich, Formen des Produktes in die gewünschte Zubereitungsform, hergestellt.

Die erfindungsgemäßen Formulierungen können in Form von diskreten Einheiten vorliegen, wobei jede Form eine bestimmte Menge des aktiven Bestandteils enthält. Sie können ebenfalls in Form eines Pulvers 45 oder in Form eines Granulats oder in Form einer Lösung oder in Form einer Suspension in einer wässrigen oder nichtwässrigen Flüssigkeit oder in Form einer Öl-in-Wasser-Emulsion oder Wasser-in-Öl-Emulsion vorliegen. Der aktive Bestandteil kann ebenfalls in Form eines Bolus, eines Elektuariums oder einer Paste vorliegen.

Wenn die erfindungsgemäßen Formulierungen für die parenterale Verabreichung vorgesehen sind, 50 enthalten sie üblicherweise eine sterile wässrige Zubereitung des aktiven Bestandteils, die vorzugsweise mit dem Blut des Empfängers isotonisch ist. Die erfindungsgemäßen Formulierungen für die parenterale Verabreichung können auch in Form eines Pulvers in einem sterilen Fläschchen, z. B. als Lyophilisat, vorliegen, wobei der aktive Bestandteil unmittelbar vor Gebrauch durch Lösen mit Aqua inj. für die Verabreichung zubereitet wird.

55 Erfindungsgemäße Zubereitungen, die für die intraartikuläre Verabreichung geeignet sind, können in Form einer sterilen wässrigen Zubereitung des aktiven Bestandteils vorliegen, wobei der aktive Bestandteil gegebenenfalls in mikrokristalliner Form vorliegt, z. B. in Form einer wässrigen mikrokristallinen Suspension.

Die erfindungsgemäßen Formulierungen können ebenfalls in Form einer liposomalen Zubereitung oder in Form eines bioabbaubaren Polymersystems zur Verabreichung des aktiven Bestandteils vorliegen.

Für die topische Verabreichung geeignete erfindungsgemäße Formulierungen enthalten flüssige oder halbflüssige Zubereitungen, wie z. B. Einreibemittel, Lotionen, Verbände, Öl-in-Wasser- oder Wasser-in-Öl-
5 Emulsionen, wie z. B. Cremes, Salben oder Pasten, oder Lösungen oder Suspensionen, wie z. B. Tropfen. Zum Beispiel kann der aktive Bestandteil für die ophthalmologische Verabreichung in Form von wässrigen Augentropfen, beispielsweise in Form einer 0,1 bis 1,0 %igen Lösung, vorliegen.

Zusätzlich zu den vorhin genannten Bestandteilen können die erfindungsgemäßen Formulierungen einen oder mehrere weitere übliche und bekannte Komponenten, wie z. B. Verdünnungsmittel, Puffersub-
10 stanzen, Bindemittel, oberflächenaktive Mittel, Verdickungsmittel, Gießmittel, Konservierungsmittel, Antioxid-
antien, Emulgatoren und dergleichen enthalten.

Das hier verwendete IFN-beta wurde mit dem in der EP-A 287 075 beschriebenen Verfahren produziert, auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung des reinen rekombinanten IFN-beta liefert sehr
15 reproduzierbar IFN-beta mit einer Kohlenhydratzusammensetzung, die die vorgenannten Merkmale erfüllt. Die Schwankungsbreite ist sehr gering. Das Verfahren führt ebenfalls zu einem hochreinen IFN-beta, das aufgrund seiner hohen Volumenaktivität von 12 bis 50×10^6 IU/ml im Endprodukt die Voraussetzungen für eine high dosage-Formulierung erfüllt.

Dieses hochkonzentrierte rekombinante IFN-beta zeigt im Gegensatz zu IFN-beta geringerer Reinheit
20 und niedrigerer Volumenaktivität eine signifikant erhöhte Eigenstabilität. Diese hohe Stabilität wird ohne Zusätze und Stabilisatoren, wie sie nach dem Stand der Technik erforderlich sind, in gepufferter physiologischer Salzlösung bei neutralem pH-Wert erreicht.

Das in den erfindungsgemäßen Zubereitungen verwendete rekombinante IFN-beta besitzt eine spezifische Aktivität von mindestens 2×10^8 IU/mg. Die Reinheit des verwendeten IFN-beta beträgt mindestens >
25 98 %, bevorzugt > 99 %.

Die spezifische Aktivität wird dadurch bestimmt, daß man die antivirale Aktivität mit einem NIH-Referenzstandard vergleicht. Die Proteinkonzentration wird mit der Standardmethode nach Lowry bestimmt.

Die folgenden Beispiele dienen der Erläuterung der Erfindung, ohne diese jedoch darauf zu beschränken.

30 Beispiel 1

Herstellung des rekombinanten IFN-beta

Zum Aufbau einer Zellkulturpyramide mit CHO BIC 8622 Zellen werden die Zellen, ausgehend von einer Ampulle, schrittweise in größere Produktionsgefäß überführt und bis zu einem für die rekombinante IFN-beta Produktion geeigneten Maßstab vermehrt. Für den Aufbau der Produktionspyramide werden Roux-Flaschen, Doppelwannen, Wannenstapel und Batteriewannenstapel verwendet. Die Erntephase erfolgt im Batteriewannenstapel. Das Medium besteht aus MEM alpha minus, L-Glutamin (2 mM) und Gentamycin (50 ug/l). Um höhere Ausbeuten zu erzielen, kann 1 % bis 5 % fötales Kälberserum zugesetzt werden. Das rekombinante IFN-beta wird in das Wachstumsgsmedium sezerniert. Die Ernte, 80 l konditioniertes Medium mit 1×10^5 bis 1×10^6 IU/l rekombinatem IFN-beta, erfolgt alle 24 Stunden.

Das rekombinante IFN-beta weist in dieser Stufe eine spezifische Aktivität von $1,0 \times 10^6$ IU/mg Protein auf.

Zur Phasenverteilung werden 80 l konditioniertes Medium mit 80 l einer Mischung, enthaltend 60 l bidest. Wasser, 8.000 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 30.000 g K_2HPO_4 , 13.000 g NaCl, 9.000 g Polyethylenglykol PEG 2000, in einem Edelstahlkessel gemischt, wobei die Mischungstemperatur 15 °C beträgt. Nach einer Trennzeit von 12 Stunden wird die Unterphase entfernt und die Oberphase, ca. 20 l, für die weitere Reinigung erhalten. Die Ausbeute an rekombinantem IFN-beta beträgt nahezu 100 %.

Das rekombinante IFN-beta weist in dieser Stufe eine spezifische Aktivität von 3×10^6 IU/mg Protein auf.

Die darauffolgenden chromatographischen Reinigungsstufen können aufgrund der hohen Eigenstabilität des rekombinanten IFN-beta bei 15 °C durchgeführt werden.

Das chromatographische Reinigungsverfahren beginnt mit der Affinitätschromatographie an Blue Sepha-
55 rose FF (Pharmacia). Dazu werden 0,5 l Blue Sepharose FF in eine Chromatographiesäule mit einem Durchmesser von 10 cm gepackt und mit 1,5 l PBS äquilibriert. Die Geibetthöhe beträgt ca. 6 cm. Die Oberphase, 20 l, wird mit PBS, enthaltend 1 mol/l NaCl, 1 : 1 verdünnt und mit einer Flußrate von 3 cm/min über die Säule gepumpt. IFN-beta bindet unter diesen Bedingungen zu 95 %.

EP 0 529 300 A1

Es erfolgt eine Waschung mit 2,0 l PBS, enthaltend 1 mol/l NaCl. Anschließend erfolgt die Elution mit einem Gradienten aus 1,0 l PBS und 1,0 l PBS, enthaltend 30 % w/w Propylenglykol und 10 % w/w Ethylenglykol. Die Flußraten für Waschung und Elution betragen 4 cm/min. In der Waschung werden ca. 10 bis 15 % der Interferonaktivität, in der Elution ca. 80 % der Interferonaktivität erhalten. Das rekombinante IFN-beta weist in dieser Stufe eine spezifische Aktivität von 130×10^6 IU/mg Protein auf. Daran schließt sich die Metallchelatchromatographie an.

Dazu werden 0,25 l Chelating Sepharose (Pharmacia) in eine Chromatographiesäule mit einem Durchmesser von 8 cm gepackt. Die Gelbett Höhe beträgt ca. 4 cm. Die Säule wird mit 1,0 l, 20 mmol/l ZnCl₂-Lösung beladen und anschließend mit 3,0 l aqua bidest. gewaschen und mit 3,0 l PBS, enthaltend 1 mol/l NaCl äquilibriert. Die Flußrate beträgt jeweils 1,5 cm/min.

Das Eluat der Affinitätschromatographie wird mit PBS 1 : 2 verdünnt und mit einer Flußrate von 1,5 cm/min über die Säule gepumpt. IFN-beta bindet unter diesen Bedingungen zu ca. 100 %. Es folgt eine Waschung mit 1,0 l PBS, enthaltend 1 mol/l NaCl und anschließend erfolgt die Elution mit einem Gradienten aus 0,5 l PBS, enthaltend 1 mol/l NaCl und 0,5 l PBS, enthaltend 1 mol/l NaCl und 0,1 mol/l Imidazol. In der Waschung werden ca. 15 bis 20 % der Interferonaktivität, in der Elution ca. 70 % der Interferonaktivität erhalten. Das rekombinante IFN-beta weist in dieser Stufe eine spezifische Aktivität von 195×10^6 IU/mg Protein auf.

Darauf folgt die Size-Exclusion-Chromatographie. Dazu werden 3,0 l Sephadryl^R S-200 (Pharmacia) in eine Chromatographiesäule mit einem Durchmesser von 6 cm gepackt. Die Gelbett Höhe beträgt ca. 90 cm. Die Säule wird mit 6,0 l PBS, enthaltend 0,1 mol/l NaCl, äquilibriert. Die Flußrate beträgt 0,5 cm/min. Der Auftrag auf die SEC-Säule beträgt ca. 0,2 l des Eluats der Metallchelatsäule. Die Flußrate beträgt 0,8 cm/min. Die Chromatographie erfolgt mit 3,0 l PBS, enthaltend 0,1 mol/l NaCl, mit einer Flußrate von 0,9 cm/min. In der Elution werden ca. 70 % der Interferonaktivität erhalten. Das rekombinante IFN-beta weist eine spezifische Aktivität von 220×10^6 IU/mg und eine Proteinreinheit, bestimmt durch SDS-PAGE Elektrophorese und Silver staining, von > 99 % auf.

Das Eluat der Size-Exclusion-Chromatographie wird auf Identität (Primärsequenz, Kohlenhydratstrukturen) und Wirksamkeit (Biologischer Assay, ELISA) getestet und anschließend formuliert.

Beispiel 2

30 Formulierung des rekombinanten IFN-beta

Zur Formulierung wird das Eluat der Size-Exclusion-Chromatographie, ca. 0,8 l mit einer Interferonaktivität von 40×10^6 IU/ml und einem Proteingehalt von 0,18 mg/ml, mit PBS auf die gewünschte Volumenaktivität von z. B. 30×10^6 IU/ml verdünnt und mit 10 mg/ml humanen Serumalbumin als Füllstoff versetzt. Diese Lösung wird durch ein 0,22 μ m Filter steril filtriert. Von dieser Formulierung werden 1 ml Aliquots in DIN R2 Flaschen abgefüllt und bei - 50 °C tiefgefroren und anschließend lyophilisiert. Die verschlossenen gefriergetrockneten Fläschchen werden bei 15 °C gelagert.

40 Beispiel 3

Beispiel 3 zeigt die Stabilität von Zubereitungen mit rekombinantem IFN-beta aus CHO-Zellen mit einer Reinheit von > 99 % in flüssiger Formulierung in unterschiedlicher Zusammensetzung ohne stabilisierende Zusätze.

45 Gelöstes rekombinantes IFN-beta mit 10^8 IU/ml und einem Proteingehalt von 0,4 mg/ml wird gegen die beschriebenen Formulierungspuffer dialysiert und anschließend mit dem entsprechenden Puffer auf die geforderte Volumenaktivität verdünnt.

Die Lösung wird dann durch ein 0,22 μ m Filter steril filtriert. Anschließend wird von dieser Formulierung je 1 ml in sterilisierte Glasflaschen DIN 3 R (3 ml Volumen) abgefüllt und mit einem Stopfen verschlossen. 50 Von jeder Formulierung werden eine geeignete Anzahl von Fläschchen hergestellt, so daß für jede Stabilitätsprüfung eine neue Flasche zur Verfügung steht.

EP 0 529 300 A1

Tabelle 1

5 Formulierung I: 0,2 M NaCl
0,05 M Imidazolpuffer pH = 7,5
70 x 10⁶ IU/ml rekombinantes IFN-beta

10 Formulierung II: 0,2 M NaCl
0,1 M Natriumphosphatpuffer pH = 7,5
30 x 10⁶ IU/ml rekombinantes IFN-beta

15 Formulierung III: 0,1 M NaCl
0,05 M Natriumphosphatpuffer pH = 7,5
30 x 10⁶ IU/ml rekombinantes IFN-beta

25	Lagerzeit Wochen	Lagertemperatur °C	Formulierung		
			I	II	III
			Ausbeute in %		
30					
	1	- 20	100	100	100
35	4	- 20	100	100	100
	50	- 20	100	100	100
	1	+ 15	97	100	98
40	4	+ 15	93	97	99
	1	+ 25	92	95	98
45	4	+ 25	90	95	97

50 Tabelle 1 zeigt, daß die hohe Stabilität der erfindungsgemäßen Zubereitungen nicht von der Zusammensetzung des Puffers abhängt.

Beispiel 4

55 Beispiel 4 zeigt die Stabilität von Zubereitungen mit rekombinantern IFN-beta aus CHO-Zellen mit einer Reinheit von > 99 % in lyophilisierter Form unterschiedlicher Zusammensetzung mit humanem Serumalbumin als Füllstoff. Es wurden keine stabilisierenden Zusätze verwendet.

Gelöstes rekombinantes IFN-beta mit einer Aktivität von 1,5 x 10⁸ IU/ml und einem Proteingehalt von 0,6 mg/ml wird gegen die angegebenen Formulierungspuffer ohne HSA dialysiert und anschließend mit dem entsprechenden Puffer mit HSA auf die geforderte Volumenaktivität verdünnt.

EP 0 529 300 A1

Die Lösung wird dann durch ein $0,22 \mu\text{m}$ Filter sterilfiltriert. Anschließend wird von jeder Formulierung je 1 ml in sterilisierte Glasflaschen DIN 3 R (3 ml Volumen) abgefüllt und lyophilisiert.

Von jeder Formulierung werden eine geeignete Anzahl von Fläschchen hergestellt, so daß für jede Stabilitätsprüfung eine neue Flasche zur Verfügung steht. Nach Beendigung des Belastungsexperiments 5 wird der Inhalt einer Flasche in 1 ml Aqua inj. gelöst und der verbleibende Wirkstoffgehalt mittels Bioassay bestimmt.

10 Tabelle 2

15	Formulierung A:	0,2 M NaCl 0,05 M Imidazolpuffer pH = 7,5 7×10^6 IU/ml rekombinantes IFN-beta 18 mg/ml humanes Serumalbumin
20	Formulierung B:	0,2 M NaCl 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH = 7,5 3×10^6 IU/ml rekombinantes IFN-beta 9 mg/ml humanes Serumalbumin
25	Formulierung C:	0,2 M NaCl 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH = 7,5 6×10^6 IU/ml rekombinantes IFN-beta 18 mg/ml humanes Serumalbumin
30	Formulierung D:	0,1 M NaCl 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH = 7,5 30×10^6 IU/ml rekombinantes IFN-beta 30 mg/ml humanes Serumalbumin
35		
40		

45

50

55

EP 0 529 300 A1

5	Lagerzeit Wochen	Lager- temperatur °C	Formulierung			
			A	B	C	D
Ausbeute in %						
10	1	- 20	100	100	100	100
	4	- 20	100	100	100	100
	36	- 20	100	100	100	100
15	1	+ 15	97	100	95	100
	30	+ 15	93	95	96	97
20	1	+ 25	92	95	96	100
	30	+ 25	90	93	96	93
25	1	+ 37	100	100	98	100
	10	+ 37	90	90	92	90
	25	+ 37	85	80	89	85
30	1	+ 51	100	100	98	95
	5	+ 51	95	95	90	93
	10	+ 51	90	90	88	88

35 Die Ergebnisse der Tabelle 2 zeigen, daß die erfindungsgemäßen Formulierungen mit rekombinantern IFN-beta eine stabile Endformulierung in physiologischem Puffer bei neutralem pH-Wert ohne weitere Zusätze zur Stabilisierung ermöglichen. Das als Zusatz verwendete Serumalbumin dient als Füllstoff für das lyophilisierte Protein, da der Proteingehalt des reinen IFN-beta nur 10 bis 200 µg beträgt.

36 Die Ergebnisse zeigen weiterhin, daß die Formulierungen auch in lyophilisierter Form sehr stabil sind. 40 Der Vorteil dieser stabilen Formulierung des Wirkstoffes liegt in der langen Haltbarkeit. Ein weiterer Vorteil ist in der Lagertemperatur bei + 4 bis + 25 °C zu sehen, da eine Kühlkette, wie normalerweise für Interferon Zubereitungen erforderlich, entfällt.

Beispiel 5

45 Dieses Beispiel zeigt die Stabilität von Zubereitungen mit rekombinantern IFN-beta aus CHO-Zellen mit einer Reinheit von > 99 % in lyophilisierter Form unterschiedlicher Zusammensetzung und mit humanem Serumalbumin als Füllstoff nach Rekonstitution in 1 ml Aqua inj..

50 Gelöstes rekombinantes IFN-beta mit einer Aktivität von $1,5 \times 10^8$ IU/ml und einem Proteingehalt von 0,6 mg/ml wird gegen die angegebenen Formulierungspuffer ohne HSA dialysiert und anschließend mit dem entsprechenden Puffer mit HSA auf die geforderte Volumenaktivität verdünnt.

55 Die Lösung wird dann durch ein 0,22 µm Filter sterilfiltriert. Anschließend wird von jeder Formulierung je 1 ml in sterilisierte Glasflaschen DIN 3 R (3 ml Volumen) abgefüllt, mit einem Stopfen versehen und lyophilisiert.

Von jeder Formulierung werden eine geeignete Anzahl von Fläschchen hergestellt, so daß für jede Stabilitätsprüfung eine neue Flasche zur Verfügung steht. Nach einer Lagerzeit von 4 Wochen bei + 4 °C wird das Lyophilisat in 1 ml Aqua inj. gelöst. Diese Lösung wird dann für die Stabilitätsuntersuchungen verwendet.

Tabelle 3

Formulierung A: 0,2 M NaCl
 0,05 M Imidazolpuffer pH = 7,5
 7 x 10⁶ IU/ml rekombinantes IFN-beta
 18 mg/ml humanes Serumalbumin

Formulierung B: 0,2 M NaCl
 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH = 7,5
 3 x 10⁶ IU/ml rekombinantes IFN-beta
 9 mg/ml humanes Serumalbumin

Formulierung C: 0.2 M NaCl
 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH = 7.5
 6×10^6 IU/ml rekombinantes IFN- β
 18 mg/ml humanes Serumalbumin

Formulierung D: 0,1 M NaCl
0,05 M Natriumphosphatpuffer pH = 7,5
30 x 10⁶ IU/ml rekombinantes IFN-beta
30 mg/ml humanes Serumalbumin

Lagerzeit Wochen	Lager- temperatur ° C	Formulierung			
		A	B	C	D
Ausbeute in %					
1	+ 15	97	100	95	95
30	+ 15	93	95	96	97
1	+ 25	92	95	96	95
14	+ 25	90	93	96	93
1	+ 37	100	100	98	98
15	+ 37	90	90	92	90
30	+ 37	85	80	89	85
1	+ 51	90	95	95	85

EP 0 529 300 A1

Die hohe Stabilität der erfindungsgemäßen Zubereitungen wird, wie die Tabelle 3 zeigt, nicht von der Zusammensetzung des Puffers beeinflußt. Dies zeigt, daß die erfindungsgemäßen Zubereitungen nach Lyophilisation und Rekonstitution sehr stabil sind. Der Vorteil dieser stabilen Formulierung des Wirkstoffs zeigt sich vorteilhafterweise vor allem bei Infusionen über einen längeren Zeitraum bei Raumtemperatur.

5

Beispiel 6

Dieses Beispiel zeigt die reduzierte Stabilität von Zubereitungen mit rekombinantem IFN-beta aus CHO-Zellen mit einer Reinheit von > 99 % nach Behandlung mit Sialidase. Durch dieses Enzym werden definiert 10 endständige Sialinsäuren enzymatisch abgespalten.

1 mg rekombinantes IFN-beta mit einer Reinheit von > 99 % wird in 0,05 mol/l Natriumacetatpuffer, pH = 5,5, mit 0,02 mg Neuraminidase (Sialidase), Boehringer Mannheim, versetzt und bei 25 °C 2 bis 6 Stunden inkubiert. Die freigesetzte Sialinsäure wird über Anionenaustauschchromatographie bestimmt. Bei einem verbleibenden Sialinsäuregehalt von ca. 60 bis 70 % wird eine Ultrafiltration mit einer Ausschlußgrenze von 30.000 D durchgeführt. Die Neuraminidase wird im Konzentrat erhalten, während das rekombinante 15 IFN-beta im Permeat vorliegt. Nach Dialyse gegen Formulierungspuffer II und III werden die Stabilitäten wie in Beispiel 1 beschrieben bestimmt.

20

Tabelle 4

25 Formulierung II: 0,2 M NaCl

0,1 M Natriumphosphatpuffer pH = 7,5

70 x 10⁶ IU/ml rekombinantes IFN-beta

30 Formulierung III: 0,2 M NaCl

0,1 M Natriumphosphatpuffer pH = 7,5

30 x 10⁶ IU/ml rekombinantes IFN-beta

35

40	Lagerzeit Wochen	Lagertemperatur °C	Formulierung		Ausbeute in %
			II	III	
45	1	+ 16	80	85	
	30	+ 15	35	42	
50	1	+ 25	55	60	
	14	+ 25	10	15	

55

Beispiel 6 zeigt den Zusammenhang zwischen Sialisierungsgrad und Stabilität von rekombinantem IFN-beta.

Der deutlich geringere Sialinsäuregehalt von ca. 60 bis 70 % führt zu einer erhöhten Instabilität des IFN-beta. Mit der Reduzierung des Sialinsäuregehaltes geht parallel eine Reduzierung der Löslichkeit einher und das IFN-beta neigt zu Trübungen und Präzipitationen.

5 **Beispiel 7**

In diesem Beispiel wurde die Zusammensetzung des Kohlenhydratanteils von IFN-beta, produziert in FS4-Zellen in Zellkultur, und dem erfindungsgemäßen rekombinantern IFN-beta, produziert in CHO-Zellkulturen, untersucht. Soweit noch nicht angegeben, sind die Verfahren zur Bestimmung des Kohlenhydratanteils in The Journal of Biological Chemistry, Vol. 262, Nr. 30, Oktober 25, 1987, Seite 25, beschrieben. Die Primärstrukturen des rekombinantern IFN-beta aus CHO-Zellen und des IFN-beta aus FS4-Zellen sind identisch.

10 Im Vergleich zum natürlichen IFN-beta aus Fibroblasten (FS4) zeigt das erfindungsgemäße rekombinante IFN-beta aus CHO-Zellen einen deutlich erhöhten Anteil im Bereich der triantennären und höhersialisierten Strukturen. Der Sialisierungsgrad bei natürlichem IFN-beta liegt bei ca. 70 %, beim erfindungsgemäßen rekombinantern IFN-beta deutlich über 85 %.

15 Das wie vorstehend beschriebene hergestellte rekombinante IFN-beta ist überraschend klinisch wesentlich wirksamer als natürliches IFN-beta, wie die folgenden Beispiele zeigen.

20 **Beispiel 8**

Klinische Versuche

Patient: männlich, 43 Jahre, homosexuell
25 Erkrankung: AIDS, Klassifikation: CDC IV/WR 5 Kaposi-Sarkome am gesamten Integument mit Beteiligung der Mundschleimhaut
Therapie: 3 x 10⁶ IU erfindungsgemäßes rekombinantes IFN-beta, wie o. a., subcutan 3 x/Woche über 9 Wochen plus Zidovudine 500 mg/d
Ergebnis: Verringerung der Kaposi-Sarkome in Größe und Anzahl
30 Therapie: 3 x 10⁶ IU hochgereinigtes natürliches IFN-beta subcutan 3 x/Woche über 6 Wochen plus Zidovudine 500 mg/d
Ergebnis: Auftreten neuer Kaposi-Sarkome
Therapie: 3 x 10⁶ IU erfindungsgemäßes rekombinantes IFN-beta, wie o. a., subcutan 3 x/Woche kontinuierlich plus Zidovudine 500 mg/d über ca. 6 Wochen
35 Ergebnis: Verringerung der Kaposi-Sarkome in Größe und Anzahl

Beispiel 7

Klinische Versuche

40 Patient: männlich, 47 Jahre, homosexuell
Erkrankung: AIDS, Klassifikation: CDC IV/WR 5 Kaposi-Sarkome am gesamten Integument
Therapie: 3 x 10⁶ IU erfindungsgemäßes rekombinantes IFN-beta, wie o. a., subcutan 3 x/Woche über 5 Wochen plus Zidovudine 1000 mg/d
Ergebnis: Verringerung der Kaposi-Sarkome in Größe und Anzahl
45 Therapie: 3 x 10⁶ IU hochgereinigtes natürliches IFN-beta subcutan 3 x/Woche über 6 Wochen plus Zidovudine 500 mg/d
Ergebnis: Vergrößerung der Kaposi-Sarkome
Therapie: 3 x 10⁶ IU erfindungsgemäßes rekombinantes IFN-beta, wie o. a., subcutan 3 x/Woche kontinuierlich plus Zidovudine 500 mg/d über ca. 6 Wochen
50 Ergebnis: Verringerung der Kaposi-Sarkome in Größe und Anzahl

Patentansprüche

55 1. Rekombinantes Human-IFN-beta, gekennzeichnet dadurch, daß es in Säugerzellkulturen produziert wird, einen Anteil an biantennären Oligosaccharid-Strukturen von mindestens 60 %, einen Anteil von triantennären Oligosaccharid-Strukturen von mindestens 15 % und einen Anteil von tetraantennären Oligosaccharid-Strukturen von 0 bis 5 % sowie einen Sialinsäuregehalt von mindestens 80 % aufweist.

EP 0 529 300 A1

2. Rekombinantes Human-IFN-beta nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil an biantennären Oligosaccharid-Strukturen mindestens 60 %, bevorzugt 70 % und am meisten bevorzugt mindestens 75 % beträgt.

5 3. Rekombinantes Human-IFN-beta nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil an triantennären Oligosaccharid-Strukturen mindestens 15 %, bevorzugt 20 % und am meisten bevorzugt mindestens 25 % beträgt.

10 4. Rekombinantes Human-IFN-beta nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die triantennären Strukturen gegebenenfalls mindestens ein N-Acetyllactosamin-Repeat aufweisen.

15 5. Rekombinantes Human-IFN-beta nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die triantennäre Struktur 1->4 und/oder 1->6 verknüpft ist.

6. Rekombinantes Human-IFN-beta nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil an tetraantennären Oligosaccharid-Strukturen 0,5 bis 3 % beträgt.

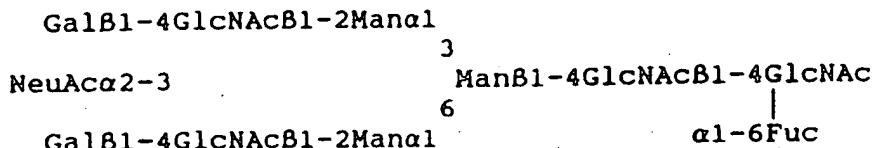
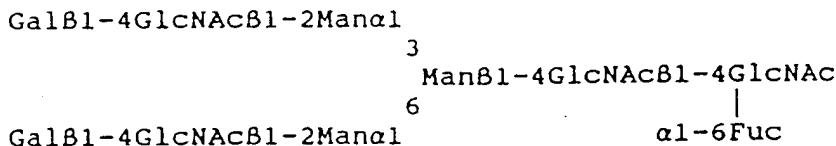
20 7. Rekombinantes Human-IFN-beta nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Sialinsäuregehalt mindestens 80 %, bevorzugt 85 % und am meisten bevorzugt > 90 % beträgt.

8. Rekombinantes Human-IFN-beta nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß sich der Sialinsäureanteil aus N-Acetylneuraminsäure und N-Glykolylneuraminsäure zusammensetzt.

25 9. Rekombinantes Human-IFN-beta nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil an N-Acetylneuraminsäure 90 bis 100 % und der Anteil an N-Glykolylneuraminsäure 0 bis 10 % beträgt.

10. Rekombinantes Human-IFN-beta nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante IFN-beta weiterhin einen Fucosegehalt von mindestens 85 %, bevorzugt 90 % und am meisten bevorzugt > 95 % aufweist.

30 11. Rekombinantes Human-IFN-beta nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Oligosaccharid-Struktur einer der folgenden Formeln entspricht:



$$\begin{array}{c}
 \text{GalB1-4GlcNAcB1-2Man}\alpha 1 \\
 | \\
 (\text{NeuAca2-3})_2 \quad \begin{array}{c} 3 \\ | \\ \text{ManB1-4GlcNAcB1-4GlcNAc} \end{array} \\
 | \\
 \text{GalB1-4GlcNAcB1-2Man}\alpha 1 \quad \begin{array}{c} \alpha 1-6\text{Fuc} \\ | \end{array}
 \end{array}$$

20 Gal β 1-4GlcNAc β 1-4
 |
 Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1
 |
 3
 Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc
 |
 6
 Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1 α 1-6Fuc

30 **GalB1-4GlcNAcB1-2Man₁**
 NeuAc α 2-3 3 **ManB1-4GlcNAcB1-4GlcNAc**
 GalB1-4GlcNAcB1-2Man₁ 6 α 1-6Fuc
 GalB1-4GlcNAcB1-6 |

$\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man} \alpha 1$
 $(\text{NeuAca}2-3)2$ $\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$
 $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man} \alpha 1$ $\alpha 1-6\text{Fuc}$
 $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-6$

10

$$\begin{array}{c}
 \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4 \\
 | \\
 \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \\
 | \\
 \text{3} \\
 (\text{NeuAca2-3})_2 \quad \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc} \\
 | \\
 \text{6} \\
 \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 \quad \text{a1-6Fuc}
 \end{array}$$

20

$\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1$
 $\text{(NeuAc}\alpha 2\text{-}3\text{)}_3$ $\text{Man}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\alpha 1$
 $\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1$ $\alpha 1\text{-}6\text{Fuc}$
 $\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}6$

30

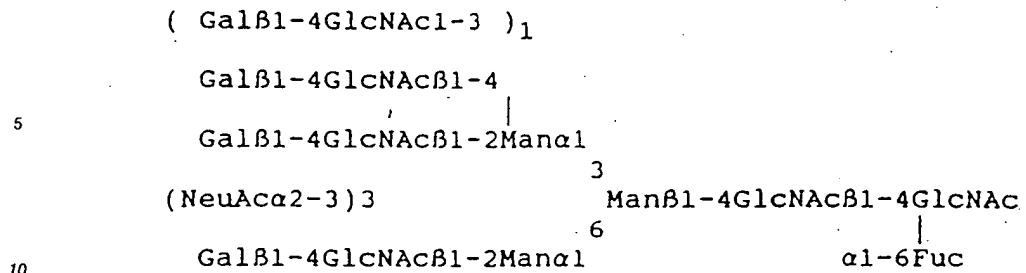
40 (Gal β 1-4GlcNAc1-3)₁

41 Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1
3

42 (NeuAc α 2-3)₃ Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc
6 |
43 Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1 α 1-6Fuc
|
44 Gal β 1-4GlcNAc β 1-6

50

55



wobei NeuAc auch für N-Glykolylneuraminsäure steht.

15 12. Rekombinantes Human-IFN-beta nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es in CHO-Zellen produziert wird.

13. Rekombinantes Human-IFN-beta nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es eine spezifische Aktivität von mindestens 200×10^6 IU/mg aufweist.

20 14. Verfahren zur Herstellung von rekombinantem Human-IFN-beta nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß eine wäßrige Lösung von Human-IFN-beta in unreinem Zustand durch eine flüssig/flüssig Phasenextraktion angereichert wird, dann einer Farbstoff-Affinitätschromatographieunterzogen wird, anschließend eine Metallchelatchromatographie durchgeführt wird, der eine Size-Exclusion-Chromatographie folgt, wobei die jeweiligen Chromatographieschritte in jeder beliebigen Reihenfolge durchgeführt werden können.

25 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die flüssig/flüssig Phasenextraktion mit einem wäßrigen Zweiphasensystem auf Basis Polyalkylenglykol/Dextran oder Polyalkylenglykol/Salz durchgeführt wird.

30 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß als Polyalkylenglykol Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht von 1.000 bis 6.000 oder Polypropylenglykol mit einem Molekulargewicht von 1.500 bis 4.000 verwendet wird.

35 17. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß als Salz NaCl, LiCl, NaJ, KJ, Na₂SO₄, Na₂HPO₄, K₂HPO₄, K₂SO₄, NaH₂PO₄, KCl, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, Na-Citrat oder Na-Oxalat verwendet wird.

40 18. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff in der Affinitätschromatographie Cibacron Blau F 3 GA ist.

19. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß in der Metallchelatchromatographie Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ oder Ni²⁺ Ionen verwendet werden.

45 20. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß für die Size-Exclusion-Chromatographie Trennmedien verwendet werden, die einen Trennbereich von 1.000 Dalton bis 600.000 Dalton, vorzugsweise Sephadex[®] G150, Sephadex[®] G150 superfine, Sephadryl[®] S-200 High Resolution, Superose 12 prep grade oder TSK-SW 3000 verwendet werden.

50 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 und 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Elution in der Affinitätschromatographie mit PBS, enthaltend 10 bis 70 Gew.-% Ethylenglykol und/oder 20 bis 50 Gew.-% Propylenglykol, erfolgt.

55 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 und 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Elution in der Metallchelatchromatographie mit kompetitiven Substanzen wie Imidazol, Histidin, Glycin oder NH₄Cl oder einem pH-Gradienten von etwa pH 7 bis etwa pH 2 oder durch isokratische Elution mit fallenden pH-Werten erfolgt.

EP 0 529 300 A1

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 und 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Elution in der Size-Exclusion-Chromatographie mit PBS, enthaltend 0 bis 0,5 mol/l NaCl erfolgt.
24. Pharmazeutische Zubereitung enthaltend rekombinantes Human-IFN-beta nach einem der Ansprüche 1 bis 13, oder hergestellt nach einem Verfahren gemäß der Ansprüche 14 bis 23, in Verbindung mit üblichen Träger- und Hilfsstoffen.
25. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens 25×10^6 IU/ml IFN-beta enthält.
26. Pharmazeutische Formulierung nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer für die topische oder parenterale Verabreichung geeigneten Form vorliegt.
27. Pharmazeutische Formulierung nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß sie in Form eines Gels, einer Emulsion oder einer Salbe vorliegt.
28. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß sie in Form eines Lyophilisates, einer Lösung oder einer Infusion vorliegt.
29. Verwendung einer pharmazeutischen Zubereitung nach einem der Ansprüche 24 bis 28 zur Behandlung von Tumorerkrankungen.
30. Verwendung einer pharmazeutischen Zubereitung nach Anspruch 29 zur Behandlung des Kaposi-Sarkoms.

25

30

35

40

45

50

55



Europäisches
Patentamt **EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT**,
der nach Regel 45 des Europäischen Patent-
Übereinkommens für das weitere Verfahren als
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 92112427.7
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betreff Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int Cl.)
X	EP - A - 0 388 799 (INTERPHARM LABORATORIES LTD) * Ansprüche 8,9,4-6 *	1,12, 24-28	C 07 K 15/26 C 07 K 3/28 A 61 K 37/66
A	EP - A - 0 083 069 (KYOWA HAKKO KOGYO CO) * Ansprüche 6,7 *	1-23	
A	WO - A - 83/03 103 (CETUS CORPORATION) * Ansprüche 1-10,12-29 *	14-23	
A	EP - A - 0 070 906 (JAPANESE FOUND CANCER RES.) * Ansprüche 1-4 *	1-23	
			RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int Cl.)
			C 07 K 15/00 C 07 K 3/00 C 07 K 13/00 C 12 N 5/00 C 12 N 15/00 C 12 P 21/00 C 07 H 21/00 A 61 K 37/00
UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE <p>Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung den Vorschriften des Europäischen Patentübereinkommens so wenig, daß es nicht möglich ist, auf der Grundlage einiger Patentansprüche sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik durchzuführen.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche: 1-28</p> <p>Unvollständig recherchierte Patentansprüche: -</p> <p>Nicht recherchierte Patentansprüche: 29,30 Art. 52(4) EPÜ;</p> <p>Grund für die Beschränkung der Recherche: Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers</p>			
Recherchenort WIEN	Abschlußdatum der Recherche 11-12-1992	Prüfer SCHARF	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmelde datum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			